

08
Bibliotheek
Proefstation
Naaldwijk

A
3
R
85

station voor de Groenten- en Fruitteelt onder Glas te Naaldwijk

263

BIBLIOTHEEK
PROEFSTATION voor de GROENTEN- en
FRUITTEELT onder GLAS te NAALDWIJK

Onderzoek naar een nieuwe inoculatiemethode
ter verkorting van de incubatieperiode van
het komkommer bleke-vruchten-virus (1972)

door

W.Th. Runia

Naaldwijk, oktober 1974

Project D 1

2242273

A
3
R
85

Inhoud

	pag.
Inleiding	2
Materiaal en methoden	2
Proef I Verschillende inoculatiemethoden	3
Proef II Scheermesinoculaties in verschillende delen van de plant	4
Proef III Verschillende scheermesinoculaties in de stengel van de komkommerplant	6
Proef IV Verschillende grootte van de komkommerplant bij inoculatie	7
Proef V Scheermesinoculatie met verschillend aantal sneetjes in de stengel	9
Proef VI Verdunningsreeksen van het K.B.V.V. met twee inoculatiemethoden	10
Samenvatting	11
Literatuur	12
Foto's	

Onderzoek naar een nieuwe inoculatiemethode ter verkorting van de incubatieperiode van het komkommer bleke vruchten-virus.

Inleiding

Inoculaties met het komkommer bleke vruchten-virus (K.B.V.V.) op komkommer gaven in het verleden bij een dagtemperatuur van 25°C en een nachttemperatuur van 20°C pas na 7 weken symptomen.

Verhoging van de temperatuur overdag naar 30°C en 's-nachts naar 25°C bracht de incubatieperiode terug tot 5 weken.

Bij een constante temperatuur van 30°C, gaven de eerste planten na 18 dagen symptomen. Het merendeel toonde echter het ziektebeeld 3 à 4 weken na de inoculatie.

De inoculaties verliepen als volgt :

de jongste bladeren van planten, die het K.B.V.V. bevatten werden afgeplukt, gemalen in een mortier en door kaasdoek geperst. Het verkregen sap werd met een watje op een komkommerplant gebracht, die bestoven was met carborundumpoeder.

De komkommerplanten hadden meestal 2 loofbladeren, die beide geïnoculeerd werden. Het carborundumpoeder dient om het bladoppervlak licht te beschadigen, zodat het virus gemakkelijker kan binnendringen.

Het K.B.V.V. behoort tot de groep van de "viroiden". Hiertoe wordt ook het citrus exocortis virus gerekend. Inoculaties met dit virus geschieden meestal door het aansnijden van een gezonde plant met een scheermesje dat besmet is met het virus (Semancik en Weathers, 1972). Er is onderzocht of deze methode perspectief bood ter verkorting van de incubatieperiode.

Materiaal en methoden

In alle proeven werd het komkommerras "Sporu" als toetsplant gebruikt. De planten werden opgepot in een 12 cm plastic pot, die 3/4 liter potgrond bevatte. De potgrond bestond uit een mengsel van laagveen, hoogveen en duinzand (10 : 7 : 1).

De planten werden éénmaal per week bijgemest en wel 0,5 gram meststof per pot. De meststof bevatte N, P_2O_5 , K_2O en MgO in de verhouding van 15 : 5 : 15 : 6.

De temperatuur en luchtvochtigheid werden geregistreerd door een thermohygrograaf. Bij iedere proef afzonderlijk zal de temperatuur worden genoemd.

De relatieve luchtvochtigheid bedroeg 60- 80 %.

In de winter werd een aanvullende belichting gegeven van 6500 lux door middel van TL-buizen.

Met een scheermesje werd het pathogeen op de gezonde planten overgebracht. Op welke manier dit gebeurde is bij iedere proef afzonderlijk vermeld. Van een scheermesje werd een hoekpunt afgebroken, die in een houder geplaatst werd (zie foto 1).

Alle proeven werden in de afdelingen van de plantenziektenkas (A1) geplaatst.

Proef I

De komkommerplanten werden op 9 augustus 1972 geïnoculeerd. Na inoculatie werden de planten in kas 13 geplaatst.

De komkommerplanten hadden bij de inoculatie 2 loofbladeren van elk gemiddeld 8 cm.

De temperatuur bedroeg overdag maximaal $35^{\circ}C$ en 's-nachts minimaal $29^{\circ}C$.

Er werden 2 inoculatiemethoden toegepast, t.w. :

methode W : dit is de oude methode, waarbij het zieke komkommermateriaal werd gemalen en door kaasdoek geperst. Het verkregen sap werd met een watje op de komkommerplant gebracht. Deze methode zal voortaan aangeduid worden met de letter W.

methode P : bij deze methode werden beurtelings de komkommerplant, welke K.B.V.V. bevatte en de gezonde komkommerplant aangesneden. Hiervoor werd steeds de stengeltop van de virusplant gebruikt. De gezonde plant werd in het hypocotyle gedeelte aangesneden (zie foto 2).

Deze methode zal worden aangeduid met de letter P.

De proef werd op 8 september 1972 beëindigd.

Tabel 1. De invloed van de inoculatiemethode op de incubatieperiode.

behandeling	besmettelijkheid	data eerste symptomen	gemiddelde incubatieperiode in dagen
methode P	4/5	20/8 1+, 21/8 2+, 31/8 1+	14
methode W	5/5	26/8 1+, 27/8 1+, 28/8 1+, 29/8 2+	19

Bespreking resultaat

Bij de behandeling met methode P werd slechts een klein aantal sneetjes in de gezonde plant gemaakt. Misschien ligt hier de verklaring voor het feit, dat maar 4 van de 5 geïnoculeerde planten ziek zijn geworden.

Het verschil in incubatieperiode tussen de methoden P en W zou 2 dagen groter zijn geweest, als de plant, die op 31-8 symptomen gaf, niet was meegeteld.

Deze plant van methode P beïnvloedt de incubatieperiode van die behandeling zeer ongunstig.

Conclusie

Er zijn duidelijk mogelijkheden aanwezig om met deze nieuwe inoculatiemethode de incubatieperiode van het K.B.V.V. te verkorten.

Proef II

De komkommerplanten werden op 22 augustus 1972 geïnoculeerd.

Na inoculatie werden de planten in kas 13 geplaatst.

Komkommerstadium bij inoculatie : zaadlobben 6 cm, 1e loofblad 2 cm.

De temperatuur bedroeg overdag maximaal 33°C en 's-nachts minimaal 29°C.

De inoculatiemethode wijkt van de vorige methoden P en W af.

Er is weer sap gemaakt van jonge komkommerblaadjes, die het K.B.V.V. bevatten. Het scheermesje werd in het sap gedoopt en vervolgens werden een paar sneetjes gemaakt in de gezonde plant. Dit werd een paar maal herhaald.

Nadat 20 planten geïnoculeerd waren, werd nieuw inoculum gemaakt, in verband met het teruglopen van de infectieusiteit.

Deze methode, waarbij het virusmateriaal eerst gemalen wordt, voordat het pathogeen met het scheermesje wordt overgebracht, wordt methode S genoemd. In deze proef werd ook met een prepareernaald geïnoculeerd.

De behandelingen waren als volgt :

1. Met prepareernaald in zaadlobben en stengel geprikt.
2. Met scheermesje in zaadlobben en stengel gesneden (sneetjes overdwars).
3. Met scheermesje in zaadlobben gesneden.
4. Met scheermesje in de stengel gesneden (sneetjes overdwars).
5. Met scheermesje in de stengel gesneden (sneetjes in de lengte)
6. Met scheermesje aan de onderkant van de zaadlobben in de nerven gesneden.
7. Met watje en carborundum geïnoculeerd.

De proef werd op 26 september beëindigd.

Tabel 2 De invloed van verschillende scheermesinoculaties op de incubatieperiode.

behandeling	besmettelijkheid	data eerste symptomen	gemiddelde incubatieperiode in dagen
1	4/5	1/9 2+, 3/9 +, 13/9 +	14
2	3/5	1/9 2+, 13/9 +	14
3	0/5	-	-
4	5/5	31/8+, 1/9 2+, 2/9+, 3/9+	10
5	4/5	1/9 3+, 3/9 +	11
6	4/5	3/9 2+, 8/9 +, 11/9+	15
7	2/5	17/9 +, 18/9 +	27

Bespreking resultaat :

Bij de behandelingen 1 en 2 bedraagt het verschil tussen de eerste plant met symptomen en de laatste 12 dagen. Bij behandeling 3 werd geen enkele plant ziek. Bij behandeling 4 zijn na 3 dagen na de eerste plant met symptomen alle planten ziek. Bij behandeling 5 is het tijdsverschil slechts 2 dagen.

Het resultaat van behandeling 6 is te vergelijken met die van de behandelingen 1 en 2.

Behandeling 7 (de controle) heeft een slecht resultaat gegeven.

Conclusie:

Het aansnijden van de stengel met het scheermesje geeft het beste resultaat.

Proef III

In deze proef werd nagegaan, hoe de stengel het beste kan worden ingesneden.

Bij behandeling 6, die op 8 september 1972 werd ingezet, werd 2 gram KCl toegevoegd aan 10 ml inoculum, om na te gaan of dit zout verbranding van de komkommerplant zou geven.

KCl is een veel gebruikt zout bij het zuiveren van K.B.V.V.-materiaal. De komkommerplanten in deze proef hadden nog geen loofbladeren. De grootte van de zaadlobben bedroeg voor de behandelingen 1, 2, 3, 4 en 7: 3,5 cm en voor behandeling 5: 1,2 cm, terwijl bij behandeling 6 de zaadlobben een lengte van 4,5 cm hadden. De komkommerplanten werden op 1 september 1972 geïnoculeerd, behalve die van behandeling 6.

Na inoculatie werden de planten in kas 8 geplaatst.

De maximum temperatuur bedroeg 33°C, de minimum temperatuur 26°C. De inoculatiemethode was methode S; er werd sap gemaakt van jong bladmateriaal, dat K.B.V.V. bevatte.

De behandelingen waren als volgt :

1. stengel in de lengte licht ingesneden
2. stengel in de lengte diep ingesneden
3. stengel overdwars licht ingesneden
4. stengel overdwars diep ingesneden
5. stengel in de lengte diep ingesneden
6. 10 ml inoculum + 2 gram KCl in stengel geïnoculeerd.
7. onbehandeld.

De proef werd op 2 oktober beëindigd.

Tabel 3. De invloed van verschillende inoculaties in de stengel op de incubatieperiode.

behandeling	besmettelijkheid	data eerste symptomen	gemiddelde incubatieperiode in dagen
1	3/5	19/9+, 24/9, 26/9+	22
2	4/5	23/9+, 24/9 2+, 25/9+	23
3	4/5	21/9+, 22/9 2+, 23/9+	21
4	4/5	19/9+, 20/9+, 23/9 2+	20
5	4/5	18/9+, 20/9+ 21/9+, 22/9+	19
6	8/10	23/9+, 24/9 2+, 25/9 3+, 28/9 2+	17
7	0/5	-	-

Bespreking resultaat :

Het valt op dat de gemiddelde incubatieperiode hoog is in vergelijking met proef II. Het is onwaarschijnlijk dat het verschil uitsluitend veroorzaakt wordt door de lagere nachttemperatuur in deze proef.

Mogelijk houdt dit verschil verband met het stadium van de komkommerplanten bij de inoculatie.

Behandeling 6 gaf geen verbranding op de planten.

Conclusie:

Het maakt geen verschil hoe de stengel geïnoculeerd wordt met het scheermesje.

Proef IV

Deze proef werd ingezet om te onderzoeken of de grootte van de komkommerplant van belang is bij de inoculatie.

De komkommerplanten werden op 12 september 1972 geïnoculeerd.

Na inoculatie werden de planten in kas 2 gezet.

De dagtemperatuur was maximaal 34°C, de nachttemperatuur was minimaal 26°C.

De stengel werd in de lengterichting geïnoculeerd.

Voor de laatste twee behandelingen is nieuw inoculum gemaakt.

Inoculatiemethode : S.

De komkommerstadia waren als volgt :

1. zaadlobben 3,5 cm.
2. zaadlobben 6 cm, 1e loofblad 2,5 cm.
3. zaadlobben 5,5 cm, 1e loofblad 6 cm.
4. zaadlobben 6 cm, 1e loofblad 11,5 cm, 2e loofblad 11 cm, 3e loofblad 3 cm.
5. zaadlobben 6 cm, 1e loofblad 12 cm, 2e loofblad 14 cm, 3e loofblad 11 cm, 4e loofblad 4 cm.
6. zaadlobben 6 cm, 1e loofblad 12 cm, 2e loofblad 16 cm, 3e loofblad 16 cm, 4e loofblad 12 cm, 5e loofblad 4 cm.

De proef werd op 5 oktober 1972 beëindigd.

Tabel IV. De invloed van verschillende komkommerstadia bij de inoculatie op de incubatieperiode.

behandeling	besmettelijkheid	data eerste symptomen	gemiddelde incubatieperiode in dagen
1	5/5	26/9+, 27/9 2+, 29/9+, 1/10+	16
2	4/4	27/9 2+, 29/9 +, 30/9+	16
3	4/4	24/9+, 28/9+, 29/9+, 30/9+	16
4	5/5	25/9 2+, 27/9+, 28/9+, 30/9+	15
5	5/5	22/9 2+, 23/9+, 24/9+, 25/9+	11
6	5/5	22/9 2+, 23/9+, 24/9 2+	11

Bespreking resultaat

Alle behandelingen gaven voor 100% zieke planten.

De behandelingen 5 en 6 gaven echter de kortste incubatieperiodes.

Conclusie:

De komkommerplanten moeten zo groot mogelijk geïnoculeerd worden om een zo kort mogelijke incubatieperiode te verkrijgen.

Proef V

Deze proef werd ingezet om na te gaan hoeveel sneetjes in de stengel nodig zijn om de plant ziek te maken. Tevens werd het aantal malen indopen in het inoculum gevarieerd om te zien of dit ook nog van invloed zou zijn op het aantal zieke planten en op de incubatieperiode.

De proef werd op 12 oktober 1972 ingezet.

Na inoculatie werden de planten in kas 13 geplaatst.

De maximum temperatuur bedroeg 30°C, de minimum temperatuur 25°C.

Het komkommerstadium bij inoculatie :

zaadlobben 4 cm, 1e loofblad 7 cm, 2e loofblad 10 cm, 3e loofblad 13 cm, 4e loofblad 11 cm, 5e loofblad 7 cm.

Inoculatiemethode : S

De behandelingen waren als volgt :

1. 1 x ingedoopt in het inoculum, 1 sneetje in de stengel gemaakt.
2. 1 x ingedoopt in het inoculum, 5 sneetjes in de stengel gemaakt.
3. 1 x ingedoopt in het inoculum, 10 sneetjes in de stengel gemaakt.
4. 1 x ingedoopt in het inoculum, 15 sneetjes in de stengel gemaakt.
5. 2 x ingedoopt in het inoculum, 10 sneetjes in de stengel gemaakt.
6. 3 x ingedoopt in het inoculum, 15 sneetjes in de stengel gemaakt.
7. onbehandeld.

De proef werd op 10 november 1972 beëindigd.

Tabel V

behandeling	besmettelijkheid	data eerste symptomen	gemiddelde incubatieperiode in dagen
1	4/4	25/10+, 30/10 2+, 4/11+	18
2	4/4	24/10 3+, 25/10+	12
3	4/4	23/10+, 24/10+, 25/10 2+	12
4	4/4	24/10 2+, 25/10 +, 27/10 +	13
5	4/4	23/10 2+, 24/10 2+	12
6	4/4	24/10+, 25/10 2+, 26/10+	13
7	0/4	-	-

Bespreking resultaat:

Alle behandelingen gaven voor 100% zieke planten.

Eén sneetje was voldoende om de plant ziek te maken, hoewel de

incubatieperiode wel 6 dagen langer was dan bij 5 tot 15 sneetjes.

Conclusie:

Het aanbrengen van 1 sneetje met het scheermesje in de stengel van de gezonde plant is reeds voldoende om het pathogeen daarin over te brengen.

Proef VI.

In deze proef werd een verdunningsreeks opgezet, waarbij zowel de W-methode als de S-methode voor het inoculeren werden gebruikt. Als verdunningsmiddel werd een buffer gebruikt, bevattende : 0,01 M fosfaat, 0,1 M.KCl, 0,01 M NaCl, 0,001 M.MgCl₂, 0,001 M. CaCl₂.

De komkommerplanten werden op 15 november 1972 geïnoculeerd.

Na inoculatie werden de planten in kas 13 geplaatst.

De dagtemperatuur was maximaal 30°C, de nachttemperatuur was minimaal 26°C.

Komkommerstadium : zaadlobben 5 cm, 1e loofblad 7 cm, 2e loofblad 8 cm, 3e loofblad 5 cm.

De behandelingen 1 t/m 5 werden met een watje geïnoculeerd.

De behandelingen 6 t/m 10 werden met een scheermesje geïnoculeerd.

De behandelingen waren als volgt :

1. verdunning 1 : 1
2. verdunning 1 : 5
3. verdunning 1 : 10
4. verdunning 1 : 20
5. verdunning 1 : 40
6. verdunning 1 : 1
7. verdunning 1 : 5
8. verdunning 1 : 10
9. verdunning 1 : 20
10. verdunning 1 : 40

De proef werd op 18 december 1972 beëindigd.

Tabel VI. De invloed van de inoculatiemethode op het verdunnings-eindpunt.

behandeling	besmettelijkheid	data eerste symptomen	gemiddelde incubatieperiode in dagen
1	5/5	29/11+, 20/11+, 3/12+, 4/12+ 7/12+	18
2	5/5	3/12+, 4/12 2+, 6/12+, 7/12+	20
3	5/5	5/12 2+, 6/12+, 8/12+, 12/12+	22
4	5/5	5/12+, 9/12+, 11/12+, 16/12+, 18/12+	27
5	4/5	5/12+, 10/12, 12/12+, 13/12+	25
6	5/5	26/11+, 27/11 4+	12
7	5/5	26/11 2+, 27/11+, 28/11+, 1/12+	13
8	4/5	26/11 2+, 27/11 2+	12
9	5/5	27/11 4+, 3/12+	13
10	5/5	27/11 2+, 28/11+, 4/12+, 7/12+	16

Bespreking resultaat :

De verdunningen hebben klaarblijkelijk te dicht bij elkaar gelegen om een aflopende besmettelijkheid waar te nemen. Dit geldt voor de W-methode zowel als de S-methode. Wel blijkt dat bij het gebruik van het scheermesje de incubatieperiode gemiddeld 9 dagen korter is dan bij het gebruik van een watje bij de inoculatie.

Conclusie:

Om een mogelijk verschil in infectieusiteit te kunnen aantonen tussen de W-methode en de S-methode zal deze proef herhaald moeten worden. De verschillen tussen de verdunningen zullen dan groter moeten zijn.

SAMENVATTING

Uit vroeger onderzoek was gebleken dat het komkommer bleke-vruchten-virus een lange incubatietijd had. Door temperatuurverhoging kon de incubatieperiode teruggebracht worden tot 3 à 4 weken.

Experimenten met een nieuwe inoculatiemethode, waarbij de stengel aangesneden wordt met een scheermesje, gaven een veel beter resultaat dan de voorheen gebruikte methode, waarbij het bladoppervlak werd geïnoculeerd met een watje. De incubatieperiode werd hierdoor verlaagd tot gemiddeld 12 dagen.

Naarmate de komkommerplanten groter zijn bij de inoculatie, zal de incubatieperiode korter zijn.

Literatuur

Semancik, J.S. & L.G. Weathers, 1972. Nature New Biology, 237 :
242-244.

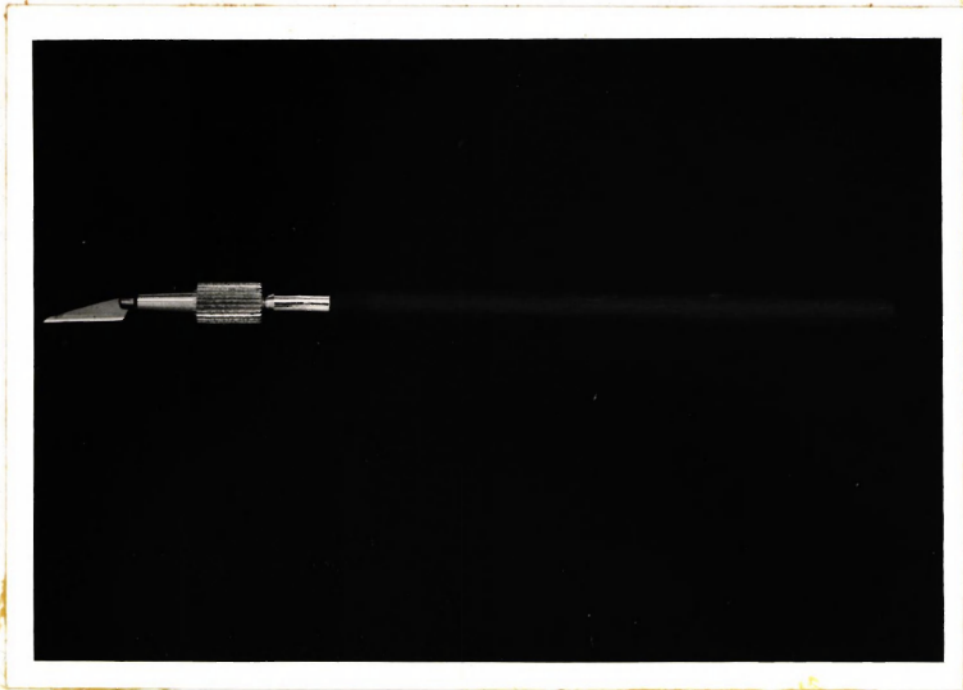


Foto 1. Scheermesje in houder geplaatst.



Foto 2. Sneetjes in het hypocotyle stengelgedeelte van de komkommer, 14 dagen na inoculatie met het scheermesje.